48　糖鎖相互作用による受容体活性制御機構の解明	鈴木　健一

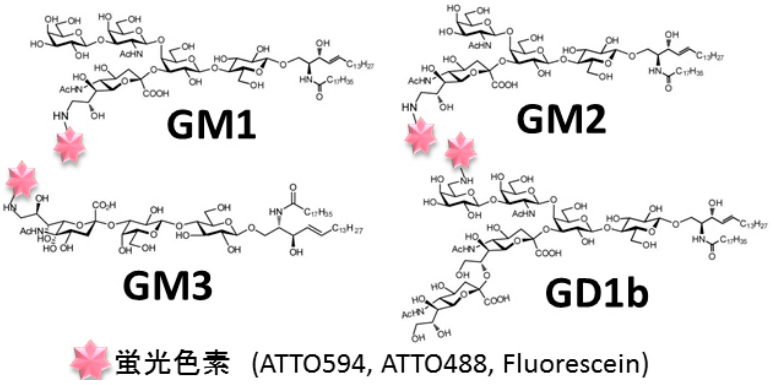
【目的】シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは、ラフト中で最も重要な分子種の一つであり、特異的機能や多くの疾患に関与するとされてきた。しかし、天然のガングリオシドと同様に挙動する蛍光プローブが存在していなかったために、生細胞の形質膜上のラフト内での挙動など、その動態は全く明らかになっていなかった。この問題を解決するために、我々は、岐阜大学の安藤教授との共同研究で、天然のガングリオシドと同様に振舞う 8 種のガングリオシド蛍光プローブの合成に成功した。本研究では、高精度 1 分子観察法を用いて、生細胞膜上でのガングリオシド動態を解明することを目的とした。

【方法】生細胞膜や人工リン脂質膜にガングリオシド蛍光プローブを再構成し、それらの 1 分子観察を 37℃で行い、ホモダイマー、オリゴマー寿命、EGF 受容体との共局在期間の測定を行った。また、1 分子 FRET 観察によって、ホモダイマー、ヘテロダイマー寿命の測定を行った。

【結果】8 種のガングリオシドプローブ（GM1、GM2、GM3、GalNAcGD1a、GD1b、GD3、GT1b、GQ1b、蛍光色素は ATTO594）を、それらのガングリオシドが発現していない細胞膜上で 1 分子観察した結果、いずれのプローブも短寿命（～200 ミリ秒）のホモダイマーを形成していることが分かった。また、このホモダイマー形成はラフト脂質相互作用によって安定化されていることが明らかとなった。さらにガングリオシドプローブは、人工リン脂質平面膜上でも、細胞膜上と同程度の寿命のホモダイマーを形成していた。従って、ガングリオシド自体の相互作用でホモダイマーが形成されていることが示唆された。ガングリオシドの様々な糖鎖のアナログ体を合成し、1 分子観察した結果、ホモダイマーの安定化に重要な官能基を特定することができた。また、1 分子 FRET 観察の結果、一般にはホモダイマーの方がヘテロダイマーよりも安定だが、ガングリオシドの組み合わせによっては、ヘテロダイマーもホモダイマーと同程度安定に存在しうることも明らかとなった。

ガングリオシドは、様々な受容体の活性制御に関わっていることがよく知られている。しかし、生細胞膜上でのその詳細な機構は明らかではない。そこで我々は、1 分子観察法により、ガングリオシドによる EGF 受容体の活性制御機構を解明しようと試みた。結果、EGF 受容体の N 型糖鎖の一部とガングリオシド GM3 との相互作用が、EGF 受容体のダイマー形成と活性化を抑制することが明らかとなった。

開発したガングリオシド蛍光プローブ



48. 糖鎖相互作用による受容体活性制御機構の解明

鈴木　健一

岐阜大学 研究推進・社会連携機構 生命の鎖統合研究センター

Key words：1 分子観察，脂質ラフト，ガングリオシド，膜受容体，シグナル伝達

緒　言

ガングリオシドは、シアル酸を一つ以上含むスフィンゴ糖脂質であり、セラミドの水酸基に糖鎖が結合した構造を持つ。ウイルスや微生物の細胞内への侵入［1］や、膜受容体の活性化や抑制［2］において非常に重要な役割を担っていて、ラフトを構成する主な成分［3］でもある。しかし、生きている細胞の形質膜上でのガングリオシドの動態、すなわち拡散や分布、他の分子との相互作用に関する知見は限られていた。その最も大きな理由の一つは、天然のガングリオシドと同じように振舞う蛍光プローブが存在していなかったことが挙げられる。例えば、GM1 の脂肪酸鎖［4］や糖鎖［5］に蛍光色素を結合させたアナログ体はあったが、界面活性剤可溶性であったり、ラフト相に分配されなかったりして、天然ガングリオシドと同じようには振る舞わないことが知られていた。

ガングリオシドに結合するタンパク質、例えばコレラトキシンサブユニット B（CTB）などもガングリオシドの局在を調べるために利用されてきた。しかし、CTB は 5 価であるため、ガングリオシドが架橋され、その局在や挙動を変えてしまうことが知られていた［6］。同様に、ガングリオシドの免疫染色実験でも、染色過程で、抗体との反応前に細胞をパラフォルムアルデヒドやグルタルアルデヒドなどで固定しても、脂質分子のほとんどは固定されることはなく、膜上での拡散は停止することはない［7］。従って、細胞固定後といえども、ガングリオシド抗体と蛍光ラベル 2 次抗体を加えると、ガングリオシドが架橋されてしまい、挙動が変わってしまう。このように、ガングリオシドの局在を細胞膜上で調べるのは、困難であった。

そこで岐阜大学・安藤研究室との共同研究でガングリオシド蛍光プローブを系統的に合成し、プローブのキャラクタリゼーションを行った。ガングリオシドは、様々な受容体の活性制御に関わっていることがよく知られている［8］。しかし、生細胞膜上でのその詳細な機構はほとんど分かっていない。そこで、生細胞膜上でガングリオシドの動態を 1 分子観察し、ガングリオシドとラフトとの相互作用、膜受容体活性制御を調べた。

方法および結果

ガングリオシドプローブを T24 細胞に導入後、界面活性剤不溶性や低温下でブレッブ膜上に形成されたラフト様相への分配を調べた結果、ATTO594 の結合したガングリオシドプローブ（図 1）［9］は、ラフトマーカーであることが確認できた。ラフトマーカーと確認できた 8 種のガングリオシドプローブを、そのガングリオシドを発現していない細胞に導入後、37℃で 1 分子イメージングした。結果、いずれのガングリオシドプローブも、その輝点同士が、90～200 ミリ秒の短期間、共局在していることを見出した（図 2）。また、1 分子 FRET も観察されたため、この輝点同士の共局在は、2 つの分子同士が相互作用したホモダイマー形成を表していることがわかった。ホモダイマー形成は、コレステロールなど脂質相互作用により安定化されていることが示唆された。また、アシアロガングリオシドのホモダイマー寿命は短いことや分子動力学計算の結果から、ガングリオシドのホモダイマーは、シアル酸同士の相互作用により安定化されていることが示唆された。一方、ガングリオシドのヘテロダイマー寿命は、一般には、ホモダイマーよりも短かったが、ヘテロダイマーの組み合わせによっては、ホモダイマーと同程度長寿命のものもあった。従って、特異的な糖鎖間の相互作用によりガングリオシドのダイマーが形成されていることが示唆された。

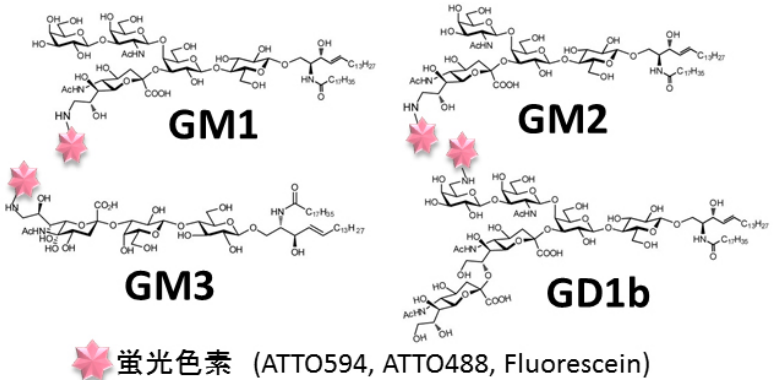


図 1. ガングリオシド蛍光プローブ

シアル酸の 9 位の炭素、または、末端のガラクトースの 6 位の炭素などに ATTO594、ATTO488、Fluorescein 基などの蛍光色素を結合すれば、ラフトマーカーとして機能した。

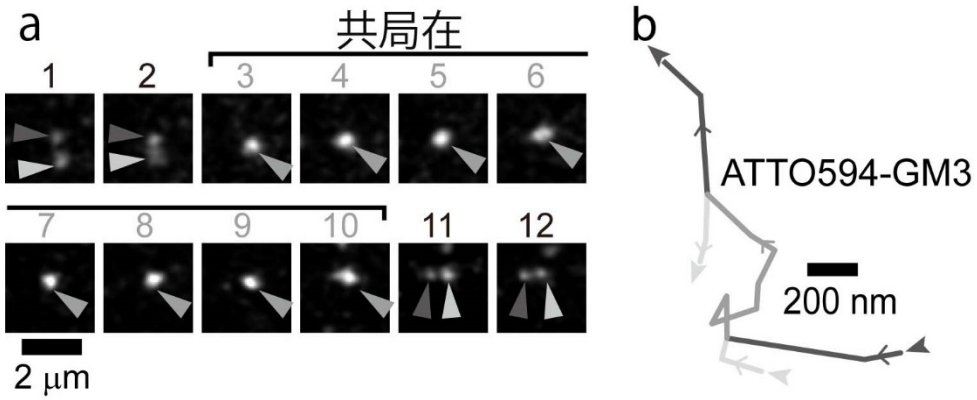


図 2. ATTO594-GM3 の 1 分子蛍光観察の連続画像（a）と 1 分子の軌跡（b）

(a)　ATTO594-GM3 の 1 分子の輝点同士がフレーム 3 から 10 まで共局在していた。

(b)　1 分子の軌跡。矢印は、フレーム 1 と 12 の位置を示している。

ガングリオシドによる EGF 受容体の活性制御機構を解明するために、EGF 受容体とガングリオシドプローブの 2 色同時 1 分子観察を行った。ガングリオシドプローブのうちで GM3 が、EGF 受容体と最も頻繁に、しかも長期間、共局在していた。GM3 の発現していない細胞膜上では EGF 受容体のダイマーの割合は増加したため、GM3 が EGF 受容体のダイマー形成を抑制していることが示唆された。また、EGF 受容体と共局在する GM3 はダイマーである場合がほとんどであることが明らかとなった。また、EGF 受容体の N 型糖鎖の一部が欠損すると、GM3 との共局在期間が著しく短くなり、EGF 受容体のダイマー形成も増加した。

一方、リガンド添加後、EGF 受容体ダイマーと GM3 とは共局在しなくなった。このことから、EGF 受容体は、リガンド添加後構造変化を起こし、GM3 の妨害を振りほどいてダイマー化することが示唆された。また、下流の Grb2 は EGF 受容体のダイマーのもとにリクルートされてくるが、特に GM3 の発現していない細胞中でリクルートが頻繁であることが判明した。このことは、GM3 が EGF 受容体の活性化を抑制していることを示唆している。

考　察

ガングリオシドと並び、代表的なラフトマーカーである GPI アンカー型タンパク質も短寿命ホモダイマーを形成することを我々は以前に見出している［10］。GPI アンカー型タンパク質のダイマー形成も ectodomain の特異的なタンパク質間相互作用により誘起されていた。ガングリオシドのホモダイマー、ヘテロダイマー形成も特異的な糖鎖間相互作用により誘起され、協同的なラフト脂質相互作用により安定化されていると示唆された。従って、GPI アンカー型タンパク質、ガングリオシド共に細胞外領域の特異的な相互作用がダイマー形成の駆動力となっていることが示唆された。今後は、ガングリオシドによる EGF 受容体以外の受容体の 2 色同時 1 分子観察を行い、受容体の活性制御機構を解明していきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岐阜大学研究推進・社会連携機構の安藤弘宗先生、河村奈緒子先生、木曽真先生、沖縄科学技術大学院大学の楠見明弘先生、京都大学物質－細胞統合システム拠点の藤原敬宏先生、中部大学大学院生命健康科学研究科の古川鋼一先生、神戸大学バイオシグナル総合研究センターの森垣憲一先生である。

文　献

1) Fleming FE, Bohm R, Dang VT, Holloway G, Haselhorst T, Madge PD, Deveryshetty J, Yu X, Blanchard H, von Itzstein M, Coulson BS. Relative riles of GM1 ganglioside. N-acylneraminic acids, and $\alpha 2\beta 1$ integrin in mediating rotavirus. J Virol 2014 Apr;88(8):4558-71. doi: 10.1128/JVI.03431-13. Epub 2014 Feb 5. PMID: 24501414

2) Coskun Ü, Grzybek M, Drechsel D, Simons K. Regulation of human EGF receptor by lipids. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 May 31;108(22):9044-8. doi: 10.1073/pnas.1105666108. Epub 2011 May 13. PMID:21571640

3) Simons K , Gerl MJ. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Oct;11(10):688-99. doi: 10.1038/nrm2977. PMID:20861879

4) Schwarzmann G, Wendeler M, Sandhoff K. Synthesis of novel NBD-GM1 and NBD-GM2 for the transfer activity of GM2-activator protein by a FRET-based assay system. Glycobiology. 2005 Dec;15(12):1302-11. Epub 2005 Aug 3. PMID:16079415

5) Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schönle A, Hell SW. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. Nature. 2009 Feb 26;457(7233):1159-62. doi: 10.1038/na pub 2008 Dec 21. PMID:19098897

6) Chinnapen DJ, Hsieh WT, te Welscher YM, Saslowsky DE, Kaoutzani L, Brandsma E, D'Auria L, Park H, Wagner JS, Drake KR, Kang M, Benjamin T, Ullman MD, Costello CE, Kenworthy AK, Baumgart T, Massol RH, Lencer WI. Lipid sorting by ceramide structure from plasma membrane to ER for the cholera toxin receptor ganglioside GM1. Dev Cell. 2012 Sep 11;23(3):573-86. doi: 10.1016/j.devcel.2012.08.002. PMID: 22975326

7) Tanaka KA, Suzuki KG, Shirai YM, Shibutani ST, Miyahara MS, Tsuboi H, Yahara M, Yoshimura A, Mayor S, Fujiwara TK, Kusumi A. Membrane molecules mobile even after chemical fixation. Nat Methods. 2010 Nov;7(11):865-6. doi: 10.1038/nmeth.f.314. Epub 2010 Oct 3. PMID:20881966

8) Yoon SJ, Nakayama K, Hikita T, Handa K, Hakomori SI. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 12;103(50):18987-91. Epub 2006 Dec 1. PMID:17142315

9) Komura N, Suzuki KG, Ando H, Konishi M, Koikeda M, Imamura A, Chadda R, Fujiwara TK, Tsuboi H, Sheng R, Cho W, Furukawa K, Furukawa K, Yamauchi Y, Ishida H, Kusumi A, Kiso M. Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. Nat Chem Biol. 2016 Jun;12(6):402-10. doi: 10.1038/nchembio.2059. Epub 2016 Apr 4. PMID:27043189

10) Suzuki KG, Kasai RS, Hirosawa KM, Nemoto YL, Ishibashi M, Miwa Y, Fujiwara TK, Kusumi A. Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. Nat Chem Biol. 2012 Sep;8(9):774-83. doi: 10.1038/nchembio.1028. Epub 2012 Jul 22 PMID:22820419